

Can 105000

538,916

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 7 月 15 日 (15.07.2004)

PCT

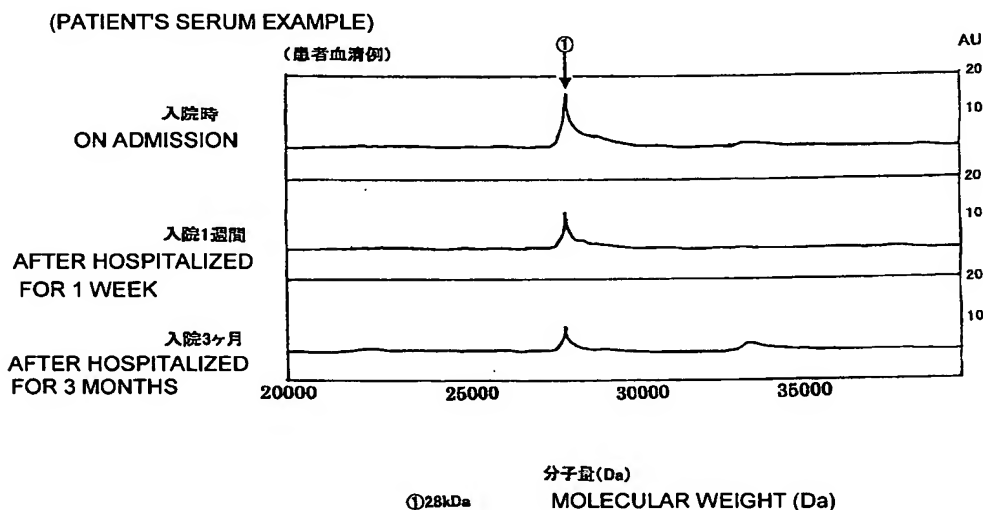
(10) 国際公開番号  
WO 2004/058966 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 14/47, 14/75, 14/775, G01N 27/62, 27/64, 33/53
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016600
- (22) 国際出願日: 2003 年 12 月 24 日 (24.12.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2002-371959  
2002 年 12 月 24 日 (24.12.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日東紡績株式会社 (NITTO BOSEKI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒960-8161 福島県 福島市 郷野目字東一番地 Fukushima (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 野村 文夫 (NO-MURA, Fumio) [JP/JP]; 〒260-0856 千葉県 千葉市 中央区亥鼻 1-8-1 千葉大学大学院医学研究院内 Chiba (JP). 曾川 一幸 (SOGAWA, Kazuyuki) [JP/JP]; 〒260-0856 千葉県 千葉市 中央区亥鼻 1-8-1 千葉大学大学院医学研究院内 Chiba (JP). 朝長 毅 (TOMONAGA, Takeshi) [JP/JP]; 〒260-0856 千葉県 千葉市 中央区亥鼻 1-8-1 千葉大学大学院医学研究院内 Chiba (JP). 落合 武徳 (OCHIAI, Takenori) [JP/JP]; 〒260-0856 千葉県 千葉市 中央区亥鼻 1-8-1 千葉大学大学院医学研究院内 Chiba (JP). 島田 英昭 (SHIMADA, Hideaki) [JP/JP]; 〒260-0856 千葉県 千葉市 中央区亥鼻 1-8-1 千葉大学大

[続葉有]

(54) Title: MARKER PROTEINS FOR DIAGNOSING LIVER DISEASE AND METHOD OF DIAGNOSING LIVER DISEASE USING THE SAME

(54) 発明の名称: 肝臓疾患診断用マーカー蛋白質およびそれを利用した肝臓疾患診断方法



(57) Abstract: Using the protein chip technology, biological samples such as sera are subjected to proteome analysis. Thus, a protein which is a human fibrinogen  $\alpha$ -E chain decomposition product and has a molecular weight of 5,900, a protein which is an apolipoprotein AII decomposition product and has a molecular weight of 7,800, and a protein which is an apolipoprotein AI decomposition product and has a molecular weight of 28,000, each showing an increase or a decrease with the habit of drinking, are newly found out. By detecting or quantifying these proteins, a liver disease in a subject such as one having a problem of drinking can be diagnosed at the early stage.

(57) 要約: プロテインチップテクノロジーを利用して血清等生体試料のプロテオーム解析を行い、習慣飲酒に伴って増減するヒトフィブリノーゲン  $\alpha$ -E 鎖 (Fibrinogen  $\alpha$ -E Chain) の分解産物であって分子量 5,900 の蛋白質、アポリポ蛋白質 AII (Apolipoprotein AII) の分解産物であって分子量 7,800 の蛋白質およびア

[続葉有]

WO 2004/058966 A1



学院医学研究院内 Chiba (JP). 大橋 建也 (OHASHI, Tatsuya) [JP/JP]; 〒963-8061 福島県 郡山市 富久山町 福原字塩島1番地 日東紡バイオケミカル研究所内 Fukushima (JP). 片山 勝博 (KATAYAMA, Katsuhiko) [JP/JP]; 〒963-8061 福島県 郡山市 富久山町福原字塩島1番地 日東紡メディカル開発センター内 Fukushima (JP).

(74) 代理人: 浅村 皓, 外 (ASAMURA, Kiyoshi et al.); 〒100-0004 東京都 千代田区 大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,

SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## 肝臓疾患診断用マーカー蛋白質およびそれを利用した肝臓疾患診断方法

## 5 技術分野

本発明は、プロテインチップテクノロジーを利用した血清試料のプロテオーム解析の結果、習慣飲酒に伴って増減し従って肝臓疾患診断用マーカー蛋白質として利用できることが見出された複数の血清蛋白質およびそれらの蛋白質の存否の検出あるいは定量により問題飲酒者等の肝臓疾患発症可能性、肝臓疾患、肝臓疾患の予後等を診断する方法に関するものである。

## 背景技術

アルコールによる臓器障害の診断の第一歩は正確な飲酒歴の把握であるが、アルコール依存は否認の病気といわれ、常習飲酒家が、その飲酒量を正確に申告しないのは古今東西変わりがない。従って、その裏づけとなる客観的なマーカーが必要である。習慣飲酒のマーカーとして最も広く測定されているのは  $\gamma$ -GTP (GGT) であるが、飲酒家が GGT 高値を示す場合でも、その値は肝障害の重症度や積算飲酒量とは必ずしも相関せず、またアルコール飲用後の GGT の変化には個体差があり、大量飲酒後にも増加しないいわゆるノンリスポンダーが相当数存在する。

一方、飲酒習慣がない場合でも肥満に伴う脂肪肝、ある種の薬剤の常用者など飲酒以外の要因で GGT が上昇する場合も多く、人間ドック等などにおいて GGT 高値、即ち飲酒家といった短絡的指導が行われる場合も少なくない。従って、GGT に相補的な検査として糖鎖欠損トランスフェリン (CDT) が北欧の研究者達により開発され、欧米の文献ではその有用性が強調されているが、日本人を対象とした成績では飲酒マーカーとしての CDT は GGT のノンレスポンダーの 10% 程度を拾いあげるにとどまっている。

エタノールの第一代謝産物であるアセトアルデヒドは反応性に富み、種々の蛋白との間で各種のアセトアルデヒド付加体を形成する。例えばアセトアルデヒド

ーヘモグロビン付加体を HPLC などにより検出する試みがなされている。糖尿病における HbA1c のように飲酒量を過去にさかのぼって推測しうる興味深いマーカーと期待されるものもあるが、感度に難があり実用化していない。

習慣飲酒は慢性肝障害の 2 大要因のひとつである。わが国の肝硬変症例において、5 純粹にアルコールのみに起因する症例の割合は 10 ～ 15 % に過ぎないとされている。しかし、これは主として大学病院などを対象にして得られたデータであり、200 万人を超えると予想されるアルコール依存症の存在を考えると、医療機関を受診する機会がないアルコール性肝障害患者が多数潜在していると予想される。また、習慣飲酒は脳出血、高血圧、痛風などの増悪因子でもあり、問題10 飲酒者を早期にかつ的確にスクリーニングすることは極めて重要である。しかし、上記のように、現在存在するいわゆる飲酒マーカーにおいて感度・特異度において決定的なものはなく、新たなマーカーを検索することが求められている。

網羅的発現タンパク解析の手法として一般的なのは二次元タンパク電気泳動であるが、低分子量蛋白またはペプチドの検出に難がある。近年、surface15 enhanced laser desorption ionization (SELDI) と飛行型質量分析計を組み合わせたプロテインチップテクノロジーが米国 CIPHERGEN 社により開発され、新規腫瘍マーカーの検出など臨床応用が始まっている。従ってこれらのプロテオミクス技術などを活用して網羅的に新たなマーカーを検索することが求められている。

20

#### 発明の開示

本発明は、問題飲酒者などの肝臓疾患を早期にしかも的確にスクリーニングしうる新規マーカーを見出し、その測定系を確立し、医療に役立てることを課題としている。

25 本発明者らは上記の課題に関して鋭意検討した結果、本発明を完成した。即ち、本発明者らはプロテインチップテクノロジーを応用し、断酒目的に入院したアルコール依存症患者において経時的に採取された血清検体を用い、習慣飲酒に伴って増減する新規の血清蛋白を同定することに成功した。そしてこれらの血清蛋白は肝臓疾患診断マーカー蛋白質として利用できることを見出し本発明を完成させ

た。

従って、本発明は、ヒトフィブリノーゲン  $\alpha$ -E 鎖 (Fibrinogen  $\alpha$ -E Chain) の分解産物であって分子量 5,900 の蛋白質 (5.9 kDa 蛋白質)、アポリポプロ  
5 テイン AII (Apolipoprotein AII) の分解産物であって分子量 7,800 の蛋白質  
(7.8 kDa 蛋白質)、アポリポプロテイン AI (Apolipoprotein AI) であって分  
子量 28,000 の蛋白質およびこれらの蛋白質の変異体であってこれらと同様の肝  
臓疾患診断用マーカー蛋白質としての機能を有する変異体から選ばれる臓疾患  
診断用マーカー蛋白質に関するものである。

更に本発明は、臓疾患が疑われる患者から得た検体中の、上記臓疾患診断  
10 用マーカー蛋白質の存否を検出しあるいはその量を測定して、臓疾患発症可能  
性、臓疾患あるいは臓疾患の予後を診断する方法に関するものである。

更に本発明は、配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列を有する新規蛋白質または  
その変異体であって該蛋白質と同様の臓疾患診断用マーカー蛋白質としての機  
能を有し且つ該アミノ酸配列と 90 % 以上の相同性を有する蛋白質もしくは配  
15 番号 1 のアミノ酸配列において 1 個から数個のアミノ酸残基が欠失、置換もし  
くは付加したアミノ酸配列を有する蛋白質である変異体に関するものである。

更に本発明は、配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列を有する新規蛋白質また  
はその変異体であって該蛋白質と同様の臓疾患診断用マーカー蛋白質としての  
機能を有し且つ該アミノ酸配列と 90 % 以上の相同性を有する蛋白質もしくは配  
20 列番号 2 のアミノ酸配列において 1 個から数個のアミノ酸残基が欠失、置換も  
しくは付加したアミノ酸配列を有する蛋白質である変異体に関するものである。

更に本発明は、上記の蛋白質またはそれらの変異体の測定方法であって、それ  
らの蛋白質または変異体に対する抗体を用いて免疫測定法により測定する測定方  
法に関するものである。

25

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、CIPHERGEN 社のプロテインチップシステムを利用し、SAXII チップを  
使用して測定されたアルコール性肝障害患者血清の測定結果である。ピークの高  
さの減少から入院時、1週間後、3ヶ月後と経時的に 28 kDa 蛋白質

(Apolipoprotein AI) が血清中から徐々に低下していることがわかる。

図 2 は、図 1 と同様に WCXII チップを使用して測定したアルコール性肝障害患者血清の測定結果である。入院時から治療に伴い経時的に、(1) 5.9 kDa 蛋白質、(2) 7.8 kDa 蛋白質の血中濃度が上昇している様子がわかる。

- 5 図 3 は、図 1 と同様に WCXII チップを使用して測定した健常人血清の測定結果である。(1) 5.9 kDa 蛋白質、(2) 7.8 kDa 蛋白質は一定の高値を示しており、図 2 と比較することにより、同蛋白質が疾患によって低下したことがわかる。

図 4 は、SDS-PAGE による 7.8 kDa 蛋白質及び 28 kDa 蛋白質の電気泳動結果である。サンプル中に目的蛋白質を含むことがわかる。

- 10 図 5 は、合成された 5.9 kDa 蛋白質の質量分析値と HPLC のデータを示す。質量分析値は、理論値に一致していることがわかる。

図 6 は、Ciphergen 社のプロテインチップシステムを利用し、WCXII プロテインチップアレイを用いて、合成された 5.9 kDa 蛋白質と飲酒しない患者血清検体のデータを比較したものである。両者とも、5.9 kDa にピークを有し、同一し

- 15 た挙動を示した。

図 7 は、種々の飲酒量の健常人や患者で、血清検体を、Ciphergen 社のプロテインチップシステムを利用し、WCXII プロテインチップアレイを用いて 5.9 kDa のピークの大小を測定したものである。飲酒量依存的に、ピークが小さくなることが判明した。

- 20 図 8 は、検体として種々の濃度の 5.9 kDa 蛋白質を含むものを用い、EIA 法（サンドイッチ ELISA 法）により吸光度を測定したものである。横軸は 5.9 kDa 蛋白質の濃度を示し、縦軸は測定された吸光度を示す。5.9 kDa 蛋白質の濃度依存的に、吸光度の上昇がみられる。すなわち、検体中の 5.9 kDa 蛋白質の濃度を EIA 法により測定できることを示している。

25

発明を実施するための形態

以下に本発明を更に詳細に説明する。

本発明により肝臓疾患診断用マーカー蛋白質として利用できることが見出された蛋白質は、ヒトフィブリノーゲン  $\alpha$ -E 鎖 (Fibrinogen  $\alpha$ -E Chain) の分解産

物であって分子量 5,900 の蛋白質（以下 5.9 kDa 蛋白質という）、アポリポ  
ロテイン AII（Apolipoprotein AII）の分解産物であって分子量 7,800 の蛋白  
質（以下 7.8 kDa 蛋白質という）およびアポリポロテイン AI

（Apolipoprotein AI）であって分子量 28,000 の蛋白質（以下 28 kDa 蛋白質  
5 という）である。これらの 5.9 kDa 蛋白質、7.8 kDa 蛋白質および 28 kDa 蛋白質は、それぞれ配列表の配列番号 1、2 および 3 に示すアミノ酸配列を持つ蛋白質である。

次にそれぞれの蛋白質を説明する。5.9 kDa 蛋白質はヒト Fibrinogen  $\alpha$ -E  
Chain の分解産物であり、54 個のアミノ酸よりなる蛋白質であって、その理論  
10 分子量は 5904.2 である。7.8 kDa 蛋白質はヒトの Apolipoprotein AII 分解産物であり、68 個のアミノ酸よりなる蛋白質であって、その理論分子量は 7753.8 である。また 28 kDa 蛋白質は Apolipoprotein AI であり、243 個のアミノ酸よりなる蛋白質であって、理論分子量 28078.8 である。これら蛋白質の中、5.9 kDa 蛋白質および 7.8 kDa 蛋白質については、その血中の存在、肝障害等にお  
15 ける臨床的意義が明らかになったのは本発明が初めてであって、新規蛋白質並びに新規マーカー物質である。また 28 kDa 蛋白質である Apolipoprotein AI は既知の蛋白質であり、脂質代謝における臨床的意義が確立して臨床的に測定されてきたものである。

本発明により肝臓疾患診断用マーカー蛋白質としての機能が見出された 5.9  
20 kDa 蛋白質、7.8 kDa 蛋白質および 28 kDa 蛋白質は、配列表に示したアミノ酸配列を有するもののみに限定されるものではなく、同様に肝臓疾患診断用マーカー蛋白質としての機能を有するそれらの蛋白質の変異体であってもよい。即ち、特に血液、組織中では多種類のエンド及びエキソプロテアーゼによって分解を受ける可能性が大きく、アミノ酸の全長や配列の長さに変化があることは十分考慮  
25 されるべきである。また組換え蛋白質作製においては発現効率を下げないために抗原性を極力変化させないようなアミノ酸変異を持たせることは定法である。よって本発明の 5.9 kDa 蛋白質、7.8 kDa 蛋白質および 28 kDa 蛋白質のそれぞれのアミノ酸配列と 90 % 以上の相同性（ここで相同性とはアミノ酸の同一性を意味する）を有する蛋白質であるそれらの変異体であってもよい。それらのアミ

ノ酸配列の長さが 15 % 以内で変化していても問題はなく、肝臓疾患診断用マーカー蛋白質としての機能を有する場合は本発明に包含される。そして好ましくは 95 % 以上の相同性を持つ蛋白質、より好ましくは 98 % 以上の相同性を持つ蛋白質がよい。アミノ酸配列の相同性は既に公知のソフトウェア、例えば Wilber, 5 W. J. and Lipman, D. J. らの方法 (Proc. Natl. Sci. USA, 80, 726-730, 1983) に記載の検索方法を原理とするソフトウェアを利用して検索できる。また GENETYX (ソフトウェア開発株式会社) などは市販される汎用ソフトであって簡単に利用できる。

本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質である 5.9 kDa 蛋白質、7.8 kDa 蛋白質および 28 kDa 蛋白質の変異体としては、配列番号 1、2 および 3 のそれぞれのアミノ酸配列において 1 個から数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有する蛋白質であって同様の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質としての機能を有する変異体でもよい。このような変異体としては、例えば 10 % 未満のアミノ酸残基が修飾を受けた蛋白質、好ましくは 5 % 未満、更に好ましくは 2 % 未満のアミノ酸残基が修飾を受けた蛋白質などが挙げられる。ア 15 ミノ酸残基の修飾は、当業者に周知の遺伝子技術によりアミノ酸変異として導入することができる。また翻訳後修飾、リン酸化、アセチル化、糖鎖付加などの周知の修飾を受けた変異体も本発明の範囲に含まれる。

以上に説明した本発明により見出された肝臓疾患診断用マーカー蛋白質に基づいて肝臓疾患の診断が可能になる。即ち、肝臓疾患が疑われる患者から得た検体 20 中の、上記肝臓疾患診断用マーカー蛋白質の存否を検出しあるいはその量を測定して、肝臓疾患発症可能性、肝臓疾患あるいは肝臓疾患の予後を診断することができる。

本発明で用いることのできる検体としては、肝臓疾患が疑われる患者から採取した血清、血漿、血液、尿などが挙げられる。

25 本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質の存否の検出あるいはその量の測定は、現在既知のあらゆる方法を採用することができる。例えば、質量分析法、免疫測定法、電気泳動法、液体クロマトグラフィー (LC) 法、ガスクロマトグラフィー (GC) 法などが挙げられる。

質量分析法としては、レーザーイオン化飛行時間型質量分析計 (LDI-TOF MS)



- により行う方法が挙げられる。レーザーイオン化飛行時間型質量分析計としては、表面増強レーザー脱離イオン化 (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization) 飛行時間型質量分析計 (SELDI-TOF MS 法)、マトリックス支援レーザーイオン化 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) 飛行時間型
- 5 質量分析計 (MALDI-TOF MS 法) などを例示できる。

- 例えば、SELDI-TOF MS 法を用いる場合、Ciphergen 社により開発されたプロテイン・バイオロジー・システム II・マス・スペクトロメーター (Ciphergen Biosystems, Inc) を使用することができる。この機械は SELDI (surface enhanced laser desorption ionization) と飛行型質量分析計を組み合わせたプ
- 10 ロテインチップテクノロジーである。その詳細は WO 01/25791 A2 号公報、特開 2001-28122 号公報等に詳しい。SELDI-TOF MS 法の場合、通常、検体を、前処理した後、チップに吸着させて、SELDI-TOF MS 質量計に付す。検体が血清の場合、アルブミンの吸着剤を用いるか、イオン交換チップでアルブミンが電荷をもたなくなるまでバッファーで洗浄してアルブミンを系から除去することが好ましい。
- 15 これらの方法に用いられるプロテインチップとしては、本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質を吸着できるチップであれば特に限定しない。例えば、疎水性やイオン交換などの蛋白質に親和性を持つ官能基が修飾されているチップ (ケミカルチップともいう)、目的の蛋白質に対する抗体を固定化したチップ (バイオケミカルチップ) 等を例示できる。
- 20 その他の質量分析法としては、例えば ESI 法 (Electrospray Ionization) による質量分析法が挙げられる。ESI 法の場合は、プロテアーゼ処理等の前処理した検体を、高速液体クロマトグラフィー等の分離手段と直結した質量分析計に付するのが好ましいことが多い。

- 免疫測定法としては、本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質に対するポリク
- 25 ロナル抗体やモノクローナル抗体を作成し、従来知られている蛋白質を測定する方法を挙げることができる。そのような免疫測定法として、酵素免疫測定法 (EIA法)、免疫比濁測定法 (TIA法)、ラテックス免疫凝集法 (LATEX法)、電気化学発光法、蛍光法などを例示することができる。またイムノクロマト法、試験紙を利用した方法も有効である。これらの方法は、いずれも当業者に周知の方

法でありこれら周知の方法をそのまま採用することができる。

上記免疫測定法に使用できる抗体としては既に汎用されている方法により作製されるポリクローナルやモノクローナル抗体が挙げられる。これらの抗体はヒト血液由来精製蛋白質、具体的には、28 kDa 蛋白質、7.8 kDa蛋白質、5.9 kDa 蛋白質を免疫原（抗原）として使用することにより得ることができる。抗体を作成するためのこれらの蛋白質は、ヒト血液から精製して入手してもよいが、公知のペプチド合成技術を用い、化学合成して入手してもよい。これに限らず培養細胞などの産生蛋白質も抗原として用いることができる。更には、遺伝子工学的に作製された完全長の組換え蛋白質、それらの変異体、それらの一部分を用いることも常套手段であり、利用され得るものである。

モノクローナル抗体は、上記したさまざまな抗原、例えば、28 kDa 蛋白質、7.8 kDa 蛋白質、5.9 kDa 蛋白質、即ち、マーカー蛋白質などを免疫原として動物を免疫し、その脾臓等に由来する抗体産生細胞と骨髓腫瘍細胞とを融合させることにより得られるハイブリドーマによって産生される。

ハイブリドーマは以下の方法によって得ることができる。即ち上述のようにして得た抗原、例えば、マーカー蛋白質をフロイントの完全、不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント、百日咳アジュバント等既に公知のものをを用いて共に混和し、感作用アジュバント液を作製して数回に分けてマウス、ラット等の動物に 1～3 週間おきに腹腔内皮下または尾静脈投与することによって免疫する。感作抗原量は通常  $1\mu\text{g}\sim 100\text{mg}$  の間とされているが、一般的には  $50\mu\text{g}$  程度が好ましい。免疫回数は 2～7 回が一般的であるがさまざまな方法が知られている。次いで脾臓等に由来する抗体産生細胞と骨髓腫瘍細胞（ミエローマ細胞）等を試験管内で融合する。融合法としては既にそれ自体公知であるケーラーとミルスタインの定法（Nature. 256, 495. 1975）によってポリエチレングリコール（PEG）を用いることで融合できる。センダイウィルス、電気融合法によっても融合を行うことができる。

融合した細胞からマーカー蛋白質を認識する抗体を産生するハイブリドーマを選択する方法としては以下のようにして行うことができる。即ち、融合した細胞から限界希釈法によって HAT 培地及び HT 培地で生存している細胞により作ら

れるコロニーからハイブリドーマを選択する。96 穴ウェルなどにまかれた融合細胞からできたコロニー培養上清中にマーカー蛋白質に対する抗体が含まれている場合には、マーカー蛋白質をプレート上に固定化したアッセイプレート上に上清をのせ、反応後に抗マウスイムノグロブリン-HRP 標識抗体等、2 次標識抗体を反応させる ELISA 法により、マーカー蛋白質に対するモノクローナル抗体産生クローンを選択できる。標識抗体の標識物質には HRP の他、アルカリ性ホスファターゼなどの酵素、蛍光物質、放射性物質等を用いることができる。またコントロールとしてブロッキング剤である BSA のみを結合したアッセイプレートによる ELISA を同時に行うことでマーカー蛋白質それぞれに対する特異的抗体のスクリーニングができることになる。つまりマーカー蛋白質プレートのいずれかで陽性であり、BSA による ELISA 法で陰性のクローンを選択する。

例えば、本発明者が樹立したハイブリドーマ CN-1 および CN-2 はヒト 5.9 kDa 蛋白質を特異的に認識するクローンであり、好ましい例として挙げることができる。ハイブリドーマ CN-1 および CN-2 は、〒305-8566 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 の独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD) にそれぞれ、平成 15 年 12 月 12 日に受託番号 IPOD FERM BP-08564 として、また平成 15 年 12 月 12 日に受託番号 IPOD FERM BP-08565 として寄託されている。

ハイブリドーマは通常細胞培養に用いられる培地、例えば  $\alpha$ -MEM、RPMI1640、ASF、S-clone など培養し、その培養上清よりモノクローナル抗体を回収することができる。ハイブリドーマが由来する動物、ヌードマウスをあらかじめプリスタン処理しておき、その動物に細胞を腹腔内注射することによって腹水を貯留させ、その腹水からモノクローナル抗体を回収することもできる。上清、腹水よりモノクローナル抗体を回収する方法としては、通常の方法を用いることができる。例えば、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどによる塩析法やクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、プロテイン A などによるアフィニティークロマトグラフィーなどが挙げられる。

上記方法によって精製された本発明によるモノクローナル抗体によって検体中の 28 kDa 蛋白質、7.8 kDa 蛋白質または 5.9 kDa 蛋白質を精密測定することが

できる。EIA法で検体中の 28 kDa蛋白質、7.8 kDa 蛋白質または5.9 kDa蛋白質を測定する方法としては、方法それ自体は公知であり、抗体としてマーカー蛋白質に対する1種または複数のモノクローナル抗体を用いることにより行うことができる。以下にその例を記述する。初めにポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリエチレン、ナイロン、ポリメタクリレートなどのそれ自体公知である固相に直接または間接的に物理結合や化学結合、アフィニティーを利用してマーカー蛋白質に対するモノクローナル抗体を結合させる。感作抗体量は通常 1 ng~100 mg/mlの範囲である。物理結合や化学結合、アフィニティーなどによって固相に結合したモノクローナル抗体に検体を加えて反応させる。一定時間

5 反応させた後、固相を洗浄し対応する二次標識抗体（例えば、抗 28 kDa蛋白質 2 次標識抗体、抗 7.8 kDa 蛋白質 2 次標識抗体、抗 5.9 kDa蛋白質2次標識抗体）を加えて更に2 次反応させる。固相を再度洗浄し、DAB発色基質などを加え反応させる。標識物質にHRPを用いた場合、基質には既知のDAB、TMBなどを用いることができ、標識物質はこれに限定されるものではない。例えば酵素だけではなく金コロイド、ユーロピウムなどの標識金属やFITC、ローダミン、Texas Red、Alexa、GFPなどの化学的、生物学的各種蛍光物質、<sup>32</sup>P、<sup>51</sup>Crなどの放射性物質

10 15 など識別可能なあらゆる物質が挙げられる。

上記した免役測定法以外にも、電気泳動法、液体クロマトグラフィー（LC）法、ガスクロマトグラフィー（GC）法などによりマーカー蛋白質を測定することができる。これらの方法も既に当業者に周知であり、それらの周知の方法をそのまま採用することができる。

20

以上に説明した方法により、肝臓疾患が疑われる患者から得た検体中の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質の存否を検出しあるいはその量を測定することにより、肝臓疾患発症可能性、肝臓疾患あるいは肝臓疾患の予後を診断することができる。

25 本発明の診断方法は、上記した質量分析により行う場合には、質量分析計によって得られるスペクトルのパターン分析によって診断することもできる。本発明の診断方法は、例えば、習慣飲酒者や問題飲酒者が肝臓疾患を発症する可能性を診断することもでき、飲酒が要因の肝臓疾患、例えば、肝炎、肝硬変などを診断することもでき、また通常の肝臓疾患を診断することもできる。更には、肝臓疾患

の治療経過などを診断することもできる。本発明の診断方法は、特にアルコール性肝障害、アルコール依存症などの診断に適している。

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例  
5 に何ら限定されるものではない。

#### 実施例 1

SAXII プロテインチップアレイを用いる肝臓疾患診断用マーカー蛋白質の同定  
インフォームド・コンセントを行なった患者血清を使用し、SAXII プロテイン  
チップアレイ (CIPHERGEN Biosystems, Inc) を用いて血清中の新規肝傷害マーカー  
10 ーを検索した。SAXII チップとは Strong Anion Exchange Chip のことであり、  
検体中の負電荷物質を結合させるという特徴を持っている。検体としてアルコール  
性肝障害患者入院直後及び禁酒後 1 週間、3 ヶ月そして正常者の血清を用い  
た。

#### (1) 方法

15 以下にプロテインチップアレイ実験操作法を簡単に述べる。血清サンプルは  
8M 尿素 (SIGMA) /1 % CHAPS (SIGMA) 溶液で 10 倍に希釈した。10 分間氷上処  
理を行なった後、50 mM トリス (SIGMA) 緩衝液 (pH 9.0) にて更に 10 倍希釈  
し、4,000 rpm、5 分間の遠心分離操作を行なってその上清を希釈サンプルとし  
て用いた。SAXII チップは Bioprocessor に取り付けて実験した。Bioprocessor  
20 とは金属チップ上に立体的ウェルを簡易作製する穴付プラスチック製アダプター  
であり、この方法によって希釈サンプルを大量にアプライできる。

初めに 150  $\mu$ L の 50 mM トリス緩衝液 (pH 9.0) をウェル状になったチップ  
に加え、振とう機上で 5 分間洗浄を行なった。これを 2 回行なった後に先の  
希釈サンプル 100  $\mu$ L を添加し、室温で 20 分間振とうしてチップと反応させ  
25 た。続いて希釈サンプルを除き、150  $\mu$ L の 50 mM トリス緩衝液 (pH 9.0) を  
加えて振とう機上で 5 分間洗浄を行なった。この操作を 3 回繰り返した。その  
後 400  $\mu$ L の蒸留水で 2 回洗浄し、チップを Bioprocessor から取り外した。  
チップが乾いた後、PAPen (Zymed) で蛋白質の接着しているスポットを囲み、  
0.5  $\mu$ L の飽和シナピン酸 (CIPHERGEN Biosystems, Inc) /50 % アセトニトリル

(Wako) /0.5 % TFA (Wako) 溶液を 2 回添加した。作製したプロテインチップアレイは、プロテイン・バイオロジー・システム II・マス・スペクトロメーター (CIPHERGEN Biosystems, Inc) によって読み取った。

## (2) 結果

- 5 図 1 に、代表的なアルコール肝障害入院時患者血清の測定データを示す。このデータフォーマットでは、SAXII プロテインチップから脱着されたサンプルのタンパク質の分子量を横軸に、その分子量で検出器に到達した分析物の量を反映するピークを縦軸で表すことができる。よって図 1 から明らかなように、アルコール性肝障害患者の入院時のデータでは、分子量 28 kDa の蛋白質のピークが観察
- 10 されたが、入院後はほとんど観察されないことが判明した。従って、この 28 kDa 蛋白質を指標として、肝臓疾患を診断できることが判った。

## 実施例 2

- WCXII プロテインチップアレイを用いる肝臓疾患診断用マーカー蛋白質の同定
- 次に実施例 1 と全く同一検体を使用し、WCXII プロテインチップアレイ
- 15 (CIPHERGEN Biosystems, Inc) を用いて血清中の新規肝傷害マーカーを検索した。WCXII チップとは Weak Cation Exchange Chip のことであり、検体中の正電荷物質を結合させるという特徴を持っている。

## (1) 方法

- 以下にプロテインチップアレイ実験操作法を簡単に述べるが殆ど実施例 1 と同
- 20 様である。血清サンプルを 8M 尿素 (SIGMA) /1 % CHAPS (SIGMA) 溶液で 10 倍に希釈した。10 分間氷上処理を行なった後、50 mM 酢酸ナトリウム (SIGMA) 緩衝液 (pH 6.5) にて更に 10 倍希釈し、4,000 rpm、5 分間の遠心分離操作を行なってその上清を希釈サンプルとして用いた。WCXII チップは Bioprocessor
- 25 (pH6.5) をウェル状になったチップに加え、振とう機上で 5 分間洗浄を行なった。これを 2 回行なった後に先の希釈サンプル 100  $\mu$ L を添加し、室温で 20 分間振とう反応させた。続いて希釈サンプルを除き、150  $\mu$ L の 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) を加えて振とう機上で 5 分間洗浄を行なった。この操作を 3 回繰り返した。その後 400  $\mu$ L の蒸留水で 2 回洗浄し、チップを

Bioprocessor から取り外した。チップが乾いた後、PAPen (Zymed) で蛋白質の  
接着しているスポットを囲み、0.5  $\mu$ L の飽和シナピン酸 (Ciphergen  
Biosystems, Inc) /50 % アセトニトリル (Wako) /0.5 % TFA (Wako) 溶液を 2  
回添加した。プロテインチップアレイは、プロテイン・バイオロジー・システム  
5 II・マス・スペクトロメーター (Ciphergen Biosystems, Inc) によって読み取っ  
た。

## (2) 結果

図 2 に代表的なアルコール性肝障害入院時患者血清の測定データ、図 3 に正常  
者の測定データを示す。図 3 から明らかなように、図 3 の正常者のデータでは、  
10 分子量 5,900 Da (5.9 kDa 蛋白質) 及び分子量 7,800 (7.8 kDa 蛋白質) のピー  
クが大きいにもかかわらず、図 2 のアルコール性肝障害患者の入院直後のデー  
タでは、ピークがほとんど認められないことが判明した。この 5.9 kDa 蛋白質  
と 7.8 kDa 蛋白質のピークは治療に従ってピークが高くなり治療効果をよく示  
している。これらの蛋白質は肝臓疾患診断用マーカー蛋白質となりうることが判  
15 った。

## 実施例 3

### 28 kDa 蛋白質の同定

(1) SAXII プロテインチップ実験によって見出された 28 kDa 蛋白質について  
FPLC Pharmacia LKB (Amersham Pharmacia Biotech AB) により、HiTrap Qカラ  
20 ムを用いて 50 mM トリス緩衝液 (pH 9.0)、流速 2 ml/min 条件下で血清サン  
プルを用いた精製を行なうと目的とする 28 kDa 蛋白質をほぼ単一に精製できた。  
このフラクションを電気泳動法により次のように確認した。フラクションは SDS  
を含む 2×サンプルバッファー (0.25 M Tris-HCl (pH 6.8), 4 % SDS, 20 %  
グリセロール, 0.01 % BPB, 10 %  $\beta$ -メルカプトエタノール) と1:1の割合で混  
25 合し、90  $^{\circ}$ C で 2 分間処理した後使用した。電気泳動は 15-25 %  
Polyacrylamid Gradient Gel (Perfect NT Gel System Products) を用いて 10  
mA で行った。

(2) 図 4 のレーン 4 および 5 に示すように、Comassie Tablet R-350 (Phast  
G1 Blue R) (Amersham Pharmacia Biotech AB) によるクマシーブリリアントブ

ルー染色によって 28 kDa の位置にバンドが確認された。

(3) 次にこのゲルのバンドを切り出して In-Gel Digestion 法によりペプチドを分離した。簡単には Gel 片を 2 回洗浄した後、35 °Cで一晩トリプシン処理した。次にこのトリプシン処理サンプルを逆相 HPLC 法により精製した。精製  
5 条件は TSK gel ODS-80Ts QA (TOSOH) カラムを用いた 0.1 % TFA と 0.09 % TFA 90 % アセトニトリルによるグラジエント溶出である。

この結果得られた 28 kDa 蛋白質フラグメントの内部アミノ酸配列を決定した。28 kDa 蛋白質のアミノ酸配列は配列表の配列番号 3 に示した。28 kDa 蛋白質フラグメントのアミノ酸配列分析を行なうとその内部配列からヒト

10 Apolipoprotein AIであることがわかった。

(4) そこでチップ実験に用いた同一血清検体を後の実施例 6 に述べる既知の自動分析機による免疫測定法を用いて測定し、Apolipoprotein AI 値を調べると表 1 のような結果が得られた。この免疫測定法結果より治療効果の認められた患者検体では治療後明らかに Apolipoprotein AI 値が低下していた。一方、プロテインチップ実験結果の 28 kDa 蛋白質 (Apolipoprotein AI) ピークも治療によ  
15 って低くなり、治療効果を反映していた。このように免疫測定法による結果とプロテインチップ実験結果が非常によく相関し、ピークの大きさは病態解析に利用できることを示していることがわかった。

#### 実施例 4

#### 20 7.8 kDa 蛋白質の同定

(1) WCXII プロテインチップ実験によって見出された 7.8 kDa 蛋白質についても 28 kDa 蛋白質と同様に FPLC Pharmacia LKB (Amersham Pharmacia Biotech AB) にて HiTrap CM Sepharose FF カラムを用い、50 mM Ammonium Acetate バッファー、流速 2 ml/min 条件下で血清サンプルの精製を行なうと目的とする 7.8 kDa 蛋白質を精製できた。プロテインチップ実験によって 7.8 kDa  
25 蛋白質の確認出来たフラクションを電気泳動法により確認した。検体血清は SDS を含む 2×サンプルバッファーと 1:1 の割合で混合し、90 °C で 2 分間処理した後使用した。電気泳動は 15-25 % Polyacrylamide Gradient Gel を用いて 10 mAで行った。



- (2) 図4のレーン2および3に示すように、クマシーブリリアントブルー染色によって 7.8 kDa の位置にバンドが確認された。この 7.8 kDa の蛋白質をほぼ単一に含むフラクションを濃縮し、先の 28 kDa 蛋白質の実施例3と同様に SDS-PAGE を行なってゲルから目的とする 7.8 kDa バンドを切り出して In-Gel Digestion 法によりペプチドを分離した。この方法は実施例3と同様であるが簡単には Gel 片を 2 回洗浄した後、35 °C で一晩トリプシン処理する。次にこのトリプシン処理サンプルを逆相 HPLC 法により精製した。精製条件は TSK gel ODS-80Ts QA (TOSOH) カラムを用いた 0.1 % TFA と 0.09 % TFA 90 % アセトニトリルによるグラジエント溶出である。
- 10 (3) 7.8 kDa 蛋白質フラグメントのアミノ酸配列分析を行なうとその内部配列からヒト Apolipoprotein AII であることがわかった。しかし完全長ヒト Apolipoprotein AII の理論分子量は 11432.4 であり、7.8 kDa 蛋白質はつまりヒト Apolipoprotein AII 分解産物であることがわかった。7.8 kDa 蛋白質のアミノ酸配列を配列番号2に示す。

## 15 実施例 5

### 5.9 kDa 蛋白質の同定

- (1) WCXII プロテインチップ実験によって見出された 5.9 kDa 蛋白質について FPLC Pharmacia LKB (Amersham Pharmacia Biotech AB) にて HiTrap CM Sepharose FF カラムを用い、50 mM Ammonium Acetate バッファー、流速 20 ml/min 条件下で血清サンプルの精製を行なうと目的とする 5.9 kDa 蛋白質を精製できた。再びプロテインチップ法により 5.9 kDa 蛋白質を多く含むフラクションをチェックした後、濃縮して HPLC (TOSOH) によって更に精製を行なった。精製条件は Sephasil protein C4 カラム (Amersham Pharmacia Biotech AB) 、アセトニトリルグラジエント、1 mL/min である。
- 25 (2) 再びプロテインチップ法によりフラクションをチェックした後、凍結乾燥により濃縮してアミノ酸配列決定を行なった。精製 5.9 kDa 蛋白質のアミノ酸配列を決定するとヒト Fibrinogen  $\alpha$ -E Chain 分解産物であることがわかった。完全長ヒト Fibrinogen  $\alpha$ -E Chain は分子量が 72488.3 であることから、5.9 kDa 蛋白質はヒト Fibrinogen  $\alpha$ -E Chain 分解産物であることがわかったので

ある。5.9 kDa 蛋白質のアミノ酸配列を配列番号 1 に示す。

- 更に 5.9 kDa 蛋白質のアミノ酸配列が正確なものであるか確認するためにその配列の蛋白質を全化学合成した。化学合成された54アミノ酸を有する蛋白質の分子量は5904.1であり理論値と一致した（図 5）。またこの合成蛋白質を用いて
- 5 実際の検体と比較検討を行った。実験は実施例 2 と全く同様の WCXII プロテインチップアレイ（CIPHERGEN Biosystems, Inc）を用いて行い、サンプルとして 100 ng/mLの濃度の合成蛋白質を反応させて、実際の血清と比較した。結果を図 6 に示す。結果として合成蛋白質のピークは血清検体の 5.9 kDa 蛋白質と一致した挙動を示し、これらの結果より、血清中の 5.9 kDa蛋白質は、アミノ酸配列
- 10 が、配列番号 1 に示したものであることが確認された。

#### 実施例 6

#### 本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質と従来の肝炎マーカーとに基づくアルコール性肝障害患者の診断比較

##### （1）方法

- 15 これまでに使用したのと同じアルコール性肝障害入院患者 16 人の入院直後、入院治療 1 週間経過後、入院治療後 3 カ月経過後の血清を用いて、従来の肝炎マーカーの測定値を求めた。自動分析機による測定は AST、GGT、TG、Apo AI 及び Apo AII については Hitachi 7150 型分析機（HITACHI）を使用して行い、試薬はそれぞれ N-アッセイ L GOT（AST）（Nittobo）、N-アッセイ L γ-GTP-H（GGT）（Nittobo）、N-アッセイ TG L（TG）（Nittobo）、N-アッセイ TIA Apo AII-H（Apo AI）（Nittobo）、N-アッセイ TIA Apo AII（Apo AII
- 20 （Nittobo）、を使用した。FDP 及び FDP-E は LPIA-S500（ダイアヤトロン）を用いて所定のパラメーターにて測定し、試薬はエルピア FDP ラテックス、エルピア FDP-E ラテックス（帝国臓器）であった。尚、プロテインチップの測定結
- 25 果をピークより数値化して比較するが単位は AU（Arbitrary Units）である。

##### （2）結果

表 1 はアルコール性肝障害によって入院した患者の一般的な血清中の臨床検査生化学系測定マーカー（AST、GGT、TG）値、免疫系測定マーカー（Apo AI、Apo AII、FDP、FDP-E）値、そしてプロテインチップ法による本発明の肝臓疾患マ

- カー蛋白質の測定結果を示す。表 1 の右から 2 番目までの欄に (FDP-E 5,900Da および Apo AII 7,800Da)、実施例 2 と同様のプロテインチップを用いた方法で本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質である 5.9 kDa 蛋白質と 7.8 kDa 蛋白質を測定した時の測定値が示されている。表 1 の右から 6 番目の欄 (Apo AI) に、
- 5 本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質である 28 kDa 蛋白質を従来法で測定した時の測定値が示されている。

表 2 には健常人の血清検体における、本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質である 5.9 kDa 蛋白質 (FDP-E 5,900Da) と 7.8 kDa 蛋白質 (Apo AII 7,800Da) をプロテインチップ法により測定した時の測定値が示されている。

- 10 表 3 は、プロテインチップ法により測定したアルコール性肝障害入院患者の 5.9 kDa 蛋白質および 7.8 kDa 蛋白質測定平均値を示す。

表 1

アルコール性肝障害患者における断酒後の臨床検査値変化

		AST	GGT	TG	Apo A I	Apo A II	FDP	FDP-E	FDP-E	Apo A II
		U/L	U/L	mg/dL	mg/dL	mg/dL	$\mu$ g/mL	ng/mL	5,900Da AU	7,800Da AU
No.1	入院時	34	542	672	144	37.3	2.99	110.32	11.7	9.9
	1週間後	39	559	246	121	27.8	2.76	135.69	24.2	10.9
	3ヵ月後	25	121	142	79	17.4	1.63	80.20	20.8	6.1
No.2	入院時	13	9	103	88	15.0	3.57	77.28	0	3.1
	1週間後	30	16	98	94	15.1	3.69	136.11	1.0	11.7
	3ヵ月後	15	3	173	95	20.8	2.65	126.56	1.8	20.0
No.3	入院時	42	68	100	155	38.2	1.37	70.18	0	0
	1週間後	22	45	91	105	26.0	7.05	592.26	0	1.7
	3ヵ月後	18	19	117	104	21.5	15.96	1257.50	0.7	5.0
No.4	入院時	86	1452	150	234	45.0	3.39	93.30	0.5	7.9
	1週間後	21	701	73	112	26.1	5.24	347.94	3.5	12.6
	3ヵ月後	15	24	68	95	17.7	7.27	516.60	17.7	21.1
No.5	入院時	24	74	93	95	21.8	0.31	35.11	0.8	2.4
	1週間後	23	64	139	86	21.0	1.36	47.86	4.8	16.1
	3ヵ月後	35	160	154	80	18.5	3.27	71.87	6.2	18.1
No.6	入院時	44	108	141	149	37.7	1.56	42.53	9.2	12.1
	1週間後	25	64	117	98	26.0	3.56	248.95	48.0	21.4
	3ヵ月後	17	24	109	83	19.3	8.88	743.54	58.0	20.0
No.7	入院時	37	272	119	218	46.5	2.54	90.77	0	0
	1週間後	27	174	77	157	33.7	2.05	91.00	23.0	18.4
	3ヵ月後	19	26	81	95	23.3	1.58	50.95	21.7	10.4
No.8	入院時	40	61	170	183	33.3	3.87	127.00	1.7	3.3
	1週間後	24	57	65	113	22.7	3.17	189.23	0	5.7
	3ヵ月後	22	36	113	101	20.6	2.35	105.10	1.8	6.9
No.9	入院時	20	77	244	114	28.4	4.33	118.19	0	0.4
	1週間後	25	65	121	109	24.9	5.03	330.58	0	7.1
	3ヵ月後	24	36	260	109	24.0	5.33	270.77	1.7	14.0
No.10	入院時								2.0	5.6
	1週間後	55	232	67	69	18.5	13.52	915.69	8.7	16.1
	3ヵ月後	17	41	54	107	20.6	0.87	35.35	1.7	21.4
No.11	入院時	38	81	187	151	34.5	2.82	58.02	15.8	19.3
	1週間後	20	67	98	116	28.1	6.33	554.17	56.0	26.4
	3ヵ月後	22	18	74	104	18.1	15.51	1310.60	52.0	18.6
No.12	入院時	18	37	103	135	24.8	1.91	43.10	0	11.7
	1週間後	17	31	110	126	19.6	1.78	68.85	0.8	6.4
	3ヵ月後	21	32	118	136	22.6	1.03	33.59	1.2	15.0
No.13	入院時	18	31	84	198	30.6	1.99	38.14	12.2	9.4
	1週間後	100	23	72	154	22.7	6.74	342.92	32.8	13.9
	3ヵ月後	17	18	80	180	22.6	14.37	1118.50	45.0	15.0
No.14	入院時	63	44	333	154	39.5	3.07	96.96	0	3.1
	1週間後	43	39	72	111	27.0	2.50	146.95	0.3	11.0
	3ヵ月後	37	26	159	92	23.2	4.73	382.86	0.3	12.1
No.15	入院時	49	86	91	146	28.9	1.35	58.93	13.0	7.0
	1週間後	19	79	82	83	23.0	2.29	59.44	28.5	17.7
	3ヵ月後	22	60	112	86	22.5	2.99	177.59	51.0	18.0
No.16	入院時	29	84	90	162	31.3	3.24	88.54	2.5	1.3
	1週間後	12	70	118	102	26.6	1.86	84.94	1.7	10.3
	3ヵ月後	16	15	96	72	17.0	5.84	213.87	2.0	13.3

表 2

健康人における 5.9 kDa、7.8 kDa 値

健康者数(n=12)	FDP-E 5.9kDa AU	Apo A II 7.8kDa AU
No.1	59.1	35.1
No.2	51.7	32.0
No.3	62.5	42.8
No.4	63.1	44.0
No.5	89.2	95.4
No.6	58.5	42.2
No.7	64.6	45.5
No.8	66.2	44.6
No.9	23.1	56.9
No.10	55.4	51.7
No.11	63.7	52.0
No.12	36.0	24.6

表 3

5 5.9 kDa、7.8 kDa 平均値

	FDP-E 5.9kDa AU	Apo A II 7.8kDa AU
健康者(n=12)	57.76	47.23
患者入院直後	4.34	6.03
患者1週間後	14.58	13.00
患者3ヶ月後	17.73	15.63

患者数(n=16)

表 1 から 3 に示されるように、汎用されてきた AST、GGT 値の低下、正常値範囲への回復は肝治療効果を反映していた。しかし GGT ノンレスポnder と思われる検体 No. 5 にみられるように、これまで汎用されてきた GGT 値が治療効果の指標になりえないケースでも、5.9 kDa 蛋白質および 7.8 kDa 蛋白質は血中値が上昇し、治療効果をよく示していた。GGT は肝障害の重症度や積算飲酒量とは必ずしも相関せず、またアルコール飲用後の GGT の変化には個体差があり、大量飲酒後にも増加しないいわゆるノンレスポnder が相当数存在するので新規蛋白質はこれら GGT ノンレスポnder の治療判定に有効であると考えられた。

実施例 7

### 飲酒量と本発明マーカー蛋白質との相関

以上の実施例により、本発明によって見つかった新規肝臓疾患診断用マーカーの特異性について有用性が確認された。更に飲酒量との相関を解明するために、以下の実験を行った。

#### 5 方法

健常人及び飲酒量の確実なアルコール摂取患者の検体だけを集めて実験を行った。実験では飲酒なしの健常人、飲酒量日本酒 1 合相当、飲酒量日本酒 3 合相当の 3 つの実験区にわけてプロテインチップ法を用いた測定を行い、それぞれの新規マーカーについて比較をした。また、プロテインチップを用いた測定方法  
10 は実施例 1 による SAXII プロテインチップアレイ、実施例 2 における WCXII プロテインチップアレイで述べたものと全く同様である。

#### 結果

結果を図 7 に示す。結果として全ての新規肝臓疾患診断用マーカー蛋白質で飲酒量依存的にピークが増減することがわかった。ここでは特に 5.9 kDa 蛋白質  
15 の結果について示す。飲酒量 5.9 kDa 蛋白質は飲酒量依存的に減少し、3 合を飲酒していた実験区ではほぼ検出できないレベルに低下していた。つまり 5.9 kDa 蛋白質は飲酒量依存的に変化し、アルコール飲酒量を推定するのに十分利用できるマーカーであることが判明した。また、アルコール依存症のマーカーとなり得ることが判明した。

#### 20 実施例 8

##### モノクローナル抗体の作製

実施例 5 で得られた完全合成 5.9 kDa 蛋白質を抗原として用いて、抗 5.9 kDa 蛋白質モノクローナル抗体を作成するため以下の実験を行った。

##### (1) 免疫

25 完全合成 5.9 kDa 蛋白質を 1 mg/ml となるようにリン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈し、50  $\mu$ g (50  $\mu$ l) をとってフロインド完全アジュバンド (WAKO) 50  $\mu$ l と乳化するまでよく混和した。調製した懸濁液を Balb/c 6 週齢 雌マウス (日本クレアー) にジエチルエーテル麻酔下にて腹腔内投与した。2週間後には同量の完全合成 5.9 kDa 蛋白質 (50  $\mu$ g/ml) をフロインド不完全アジュバンド (WAKO)

と混和してフロインド完全アジュバンドの時と全く同様の操作により乳化懸濁液とし、それぞれマウスに感作した。以降 2 週間後に同様の操作を行い、4 回目には最終免疫として完全合成 5.9 kDa 蛋白質 50  $\mu$ g/ml をリン酸緩衝液 (pH 7.0) で調製しマウス尾静脈注射により投与した。

#### 5 (2) ハイブリドーマの確立

最終免疫より 3 日後に合成 5.9 kDa 蛋白質により感作済みのマウスよりジエチルエーテル麻酔下に外科的摘出された脾臓を無菌的に分散し脾臓細胞を調製した。融合はケーラーとミルスタインの方法 (Nature. 256, 495. 1975) に従って行われ、ポリエチレングリコール (PEG4000) (MERK) を用いて脾細胞と骨髓腫細胞 P3-X63-Ag8-U1 (P3U1) を融合した。その融合比率は脾臓細胞数  $10 \times 10^7$  個に対して骨髓腫細胞 P3-X63-Ag8-U1 (P3U1)  $2 \times 10^7$  個で、5 : 1 であった。融合細胞は 10 % FCS (INVITROGEN)  $\alpha$ -MEM (IRVINE) HAT (コスモバイオ) 培地に分散し 96 穴マイクロタイターカルチャープレート (住友ベークライト) に分注して 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 条件にて培養した。

#### 15 (3) スクリーニング

約 2 週間後にコロニーの生育を確認してスクリーニングを実施した。スクリーニングの実施法を以下に述べる。スクリーニング用プレートを作製するために上記実施例にて精製した合成 5.9 kDa 蛋白質をリン酸緩衝液中に溶解し、1  $\mu$ g/100  $\mu$ l/well となるように 96 穴ウエル (Nunc) に分注した。プレートを 4 °C で 2 晩静置した後に 0.05 % Tween 20 を含むリン酸緩衝液で 3 回洗浄し、非特異的反応を抑えるために 1.5 % BSA 溶液を 200  $\mu$ l 分注して、更に 4 °C で 1 晩静置した。完成したプレートを 0.05 % Tween 20 を含むリン酸緩衝液で 3 回洗浄した後に培養上清 100  $\mu$ l を反応させ、更に洗浄を行った後に 2 次抗体である HRP 標識抗マウス イムノグロブリン抗体 (Zymed) を加えて反応させた。洗浄後に HRP の発色基質である 3 mg/ml o-フェニレンジアミン (OPD) (Nacalai tesque) クエン酸発色溶液を 100  $\mu$ l 加えて一定時間の発色後、1N 硫酸を停止液として更に 100  $\mu$ l 添加し、測定波長 492 nm にて吸光度を測定した。上記のようにして陽性になったクローンは限界希釈法によって再クローニングされ上清を再度チェックした。

#### (4) 抗体の確認

ELISAによって合成 5.9 kDa 蛋白質との反応性を確認し、クローンCN-1 およびCN-2 の2種類が合成 5.9 kDa蛋白質を認識したのとして選択した。得られた抗体をモノクローナル抗体タイピングキット (Amersham Pharmacia Biotech) にて検定した結果を表4に示す。

5

表4：モノクローナル抗体の特性

ハイブリドーマ	クラス	軽鎖
クローン CN-1	IgM	$\kappa$
クローン CN-2	IgM	$\kappa$

10

#### (5) モノクローナル抗体の作製及び精製

得られたハイブリドーマCN-1 およびCN-2細胞  $1 \times 10^7$ 細胞個をプリスタン (アルドリッチ) 0.5 ml投与後2週間のBalb/cマウス (日本クレアー)、10週齢、雌性に腹腔内投与し、約2 週間後にマウス腹腔内に貯留した腹水をジエチルエーテル麻酔下にて外科的に採取した。スクリーニングで行ったELISA法により、腹水をサンプルとして段階希釈して確認すると高濃度のモノクローナル抗体が含まれていた。この腹水を硫酸40 % で処理し、PBSに透析した後、CN-1、CN-2はS-300を用いて精製した。その結果CN-1、CN-2は非還元では分子量約900,000に単一の、メルカプトエタノール還元では分子量約70,000のバンドと25,000の2本のバンドが確認された。精製された抗体はCN-1、CN-2ともにマウス1匹あたりそれぞれ約10mg以上であって工業的利用を行うには十分量であった。

20

#### 実施例 9

##### EIA 法による 5.9 kDa 蛋白質の測定

5.9 kDa 蛋白質の2種のモノクローナル抗体CN-2、CN-1を、それぞれ、一次抗体、標識された二次抗体として使用し、ELISA 法 (EIA法) により検体中の5.9 kDa蛋白質を測定できるかどうか検討した。

25

#### (1) 方法

ELISA用プレートを作製するため、一次抗体CN-2をリン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、 $1 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}/\text{well}$ となるように96穴ウエル (Nunc) に分注した。プレ



ートを4℃で2晩静置した後に0.05% Tween 20を含むリン酸緩衝液で3回洗浄し、非特異的反応を抑えるために1.5% BSA溶液を200 μl分注して、更に4℃で1晩静置した。完成したプレートを0.05% Tween 20を含むリン酸緩衝液で3回洗浄した後に各種濃度の合成 5.9 kDa蛋白質を標準品として100 μlを添加し、室温で  
5 1時間反応させた。反応終了後、0.05% Tween 20を含むリン酸緩衝液で3回洗浄し、二次抗体であるHRP標識CN-1抗体を加えて反応させた。洗浄後にHRPの発色基質である3 mg/ml o-フェニレンジアミン (OPD) (Nacalai tesque) クエン酸発色溶液を100 μl加えて一定時間の発色後、1N硫酸を停止液として更に100 μl添加し、測定波長492 nmにて吸光度を測定した。

### 10 (3) 結果

上記のようにして測定した各種濃度の合成 5.9 kDa 蛋白質における発色値から、合成 5.9 kDa 蛋白質測定標準曲線を作成すると図8のような結果であった。図8より、合成 5.9 kDa 蛋白質の濃度依存的に、吸光度の上昇がみられた。つまり、5.9 kDa 蛋白質を認識するモノクローナル抗体CN-1とCN-2は認識部位を異  
15 にするため、これら抗体をサンドイッチELISA法に使用することにより、5.9 kDa 蛋白質を測定できることが判明した。

### 産業上の利用可能性

以上に具体的に示したように、本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質は、  
20 GGT 等の従来の肝炎マーカーが反応性の低いノンレスポnder、または肥満ともなう脂肪肝、ある種の薬剤常用者など飲酒以外の要因で GGT が高値を示す場合でも、正確に飲酒からくる肝臓疾患患者の治療判定効果を調べ状態把握を行なう指標となり得る。つまり GGT は飲酒以外にウイルス性の慢性肝障害・肥満・ある種の薬剤の連用など他の要因で上昇するために特異性が低いのに対して、こ  
25 の点、本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質はウイルス性肝硬変でも変動しないので特異性に期待がもてるという長所がある。また測定対象が生化学的酵素機能に依存しないペプチドであることから検体の取り扱いがよく、測定再現性が良いという特徴があることも判明した。本発明の診断方法は、例えば、習慣飲酒者や問題飲酒者が肝臓疾患を発症する可能性を診断することもでき、飲酒が要因の

肝臓疾患、例えば、肝炎、肝硬変などの肝臓疾患を診断することもできる。更には、そのような肝臓疾患の治療経過などを診断することもできる。本発明の診断方法は、特にアルコール性肝障害、アルコール依存症などの診断に適している。本発明の診断方法においては、マーカー蛋白質を汎用的 EIA法、イムノクロマト、

5   さらには紙験紙などにより測定して実施することができる。これらの汎用されている方法により簡便に診断可能であることは、現在の肝疾患人口から考えても今後の予防医学的見地から意義が大きいものと考えられる。

## 請 求 の 範 囲

1. ヒトフィブリノーゲン  $\alpha$ -E 鎖 (Fibrinogen  $\alpha$ -E Chain) の分解産物であ  
って分子量 5,900 の蛋白質 (5.9 kDa 蛋白質)、アポリポプロテイン AII  
5 (Apolipoprotein AII) の分解産物であって分子量 7,800の蛋白質 (7.8 kDa 蛋  
白質)、アポリポプロテイン AI (Apolipoprotein AI) であって分子量 28,000  
の蛋白質およびこれらの蛋白質の変異体であってこれらと同様の肝臓疾患診断用  
マーカー蛋白質としての機能を有する変異体から選ばれる肝臓疾患診断用マーカ  
ー蛋白質。
- 10 2. 5.9 kDa 蛋白質が配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列を有する蛋白質であ  
り、その変異体が該アミノ酸配列と 90 % 以上の相同性を有する蛋白質あるいは  
配列番号 1 のアミノ酸配列において 1 個から数個のアミノ酸残基が欠失、置換  
もしくは付加したアミノ酸配列を有する蛋白質である請求項 1 の肝臓疾患診断用  
マーカー蛋白質。
- 15 3. 7.8 kDa 蛋白質が配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列を有する蛋白質であ  
り、その変異体が該アミノ酸配列と 90 % 以上の相同性を有する蛋白質あるいは  
配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 個から数個のアミノ酸残基が欠失、置換  
もしくは付加したアミノ酸配列を有する蛋白質である請求項 1 の肝臓疾患診断用  
マーカー蛋白質。
- 20 4. アポリポプロテイン AI であって分子量 28,000 の蛋白質が配列表の配列  
番号 3 のアミノ酸配列を有する蛋白質であり、その変異体が該アミノ酸配列と  
90 % 以上の相同性を有する蛋白質あるいは配列番号 3 のアミノ酸配列において  
1 個から数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有す  
る蛋白質である請求項 1 の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質。
- 25 5. 飲酒が要因の肝臓疾患診断用の請求項 1 から 4 のいずれかの肝臓疾患診断  
用マーカー蛋白質。  
6. アルコール性肝障害診断用またはアルコール依存症診断用の請求項 5 の肝  
臓疾患診断用マーカー蛋白質。  
7. 肝臓疾患が疑われる患者から得た検体中の、請求項 1 から 6 のいずれかの

肝臓疾患診断用マーカー蛋白質の存否を検出しあるいはその量を測定して、肝臓疾患発症可能性、肝臓疾患あるいは肝臓疾患の予後を診断する方法。

8. 肝臓疾患が飲酒が要因の肝臓疾患である請求項7の診断方法。

9. 肝臓疾患がアルコール性肝障害またはアルコール依存症である請求項8の  
5 診断方法。

10. 検体中の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質の存否の検出あるいはその量の測定を質量分析法により行なう請求項7から9のいずれかの診断方法。

11. 質量分析計で得られるスペクトルのパターン分析により診断する請求項10の診断方法。

10 12. 質量分析をレーザーイオン化飛行時間型質量分析計 (LDI-TOF MS) により行う請求項10または11の診断方法。

13. レーザーイオン化飛行時間型質量分析計が表面増強レーザーイオン化飛行時間型質量分析計 (SELDI-TOF MS) である請求項12の診断方法。

14. 検体中の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質の存否の検出あるいはその量の測定を、該蛋白質に対する抗体を用いた免疫測定法により行う請求項7から9のい  
15 ずれかの診断方法。

15. 免疫測定法が、酵素免疫測定法 (EIA法)、免疫比濁測定法 (TIA法)、ラテックス免疫凝集法 (LATEX法)、電気化学発光法または蛍光法である請求項14の診断方法。

20 16. 免疫測定法が、酵素免疫測定法 (EIA 法) である請求項15の診断方法。

17. 配列表の配列番号1のアミノ酸配列を有する蛋白質またはその変異体であって該蛋白質と同様の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質としての機能を有し且つ該アミノ酸配列と90%以上の相同性を有する蛋白質もしくは配列番号1のアミノ酸配列において1個から数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミ  
25 ノ酸配列を有する蛋白質である変異体。

18. 配列表の配列番号2のアミノ酸配列を有する蛋白質またはその変異体であって該蛋白質と同様の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質としての機能を有し且つ該アミノ酸配列と90%以上の相同性を有する蛋白質もしくは配列番号2のアミノ酸配列において1個から数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミ

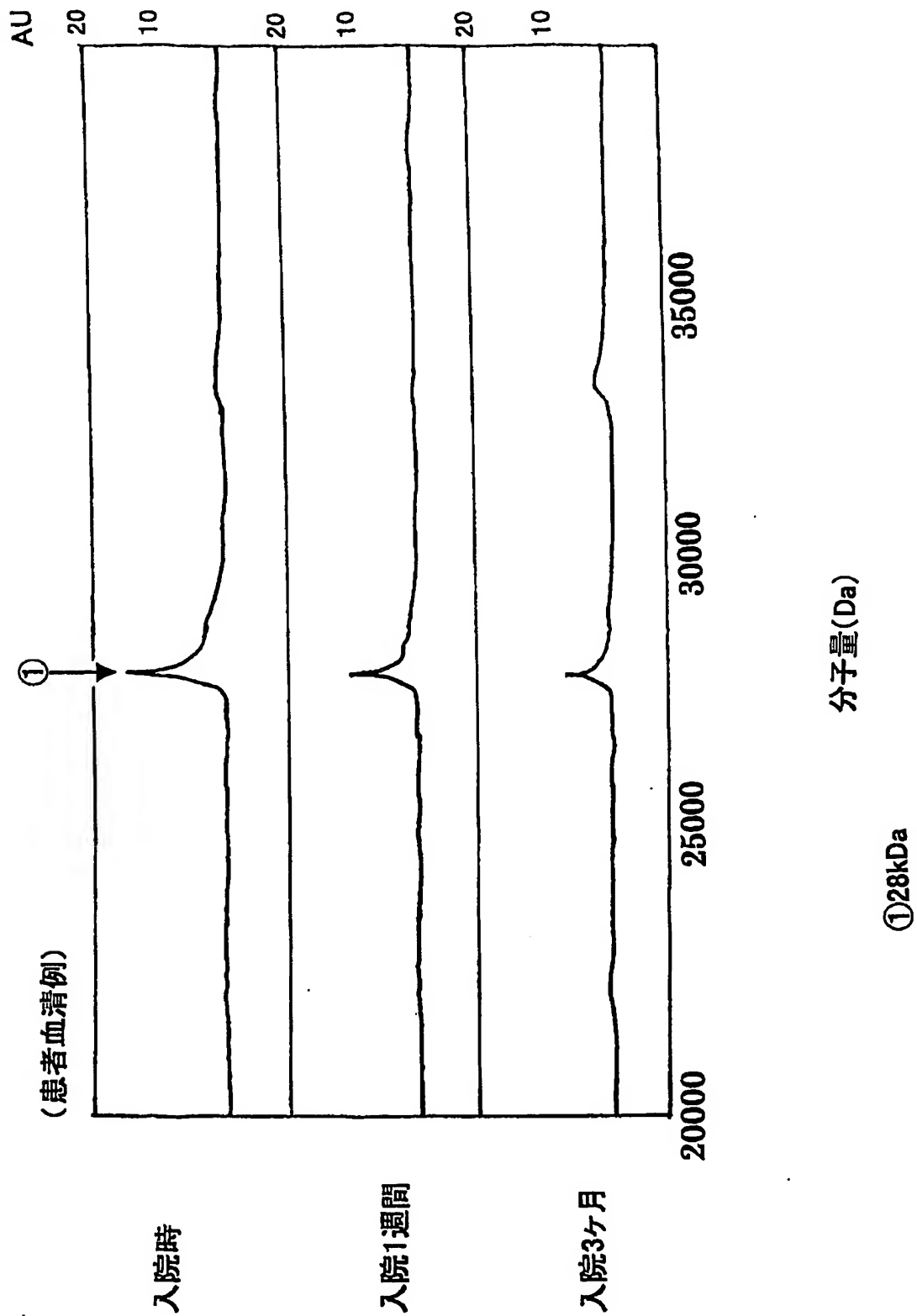
ノ酸配列を有する蛋白質である変異体。

19. 請求項 17 または 18 の蛋白質またはその変異体、あるいはアポリポプロ  
テイン AI (Apolipoprotein AI) であって分子量 28,000 の蛋白質またはその変  
異体であってそれと同様の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質としての機能を有する  
5 変異体の測定方法であって、それらの蛋白質または変異体に対する抗体を用いて  
免疫測定法により測定する測定方法。

20. 免疫測定法が、酵素免疫測定法 (EIA法)、免疫比濁測定法 (TIA法)、ラ  
テックス免疫凝集法 (LATEX法)、電気化学発光法または蛍光法である請求項 1  
9 の診断方法。

- 10 21. 免疫測定法が、酵素免疫測定法 (EIA 法) である請求項 20 の診断方法。

FIG.1



2/8

FIG.2

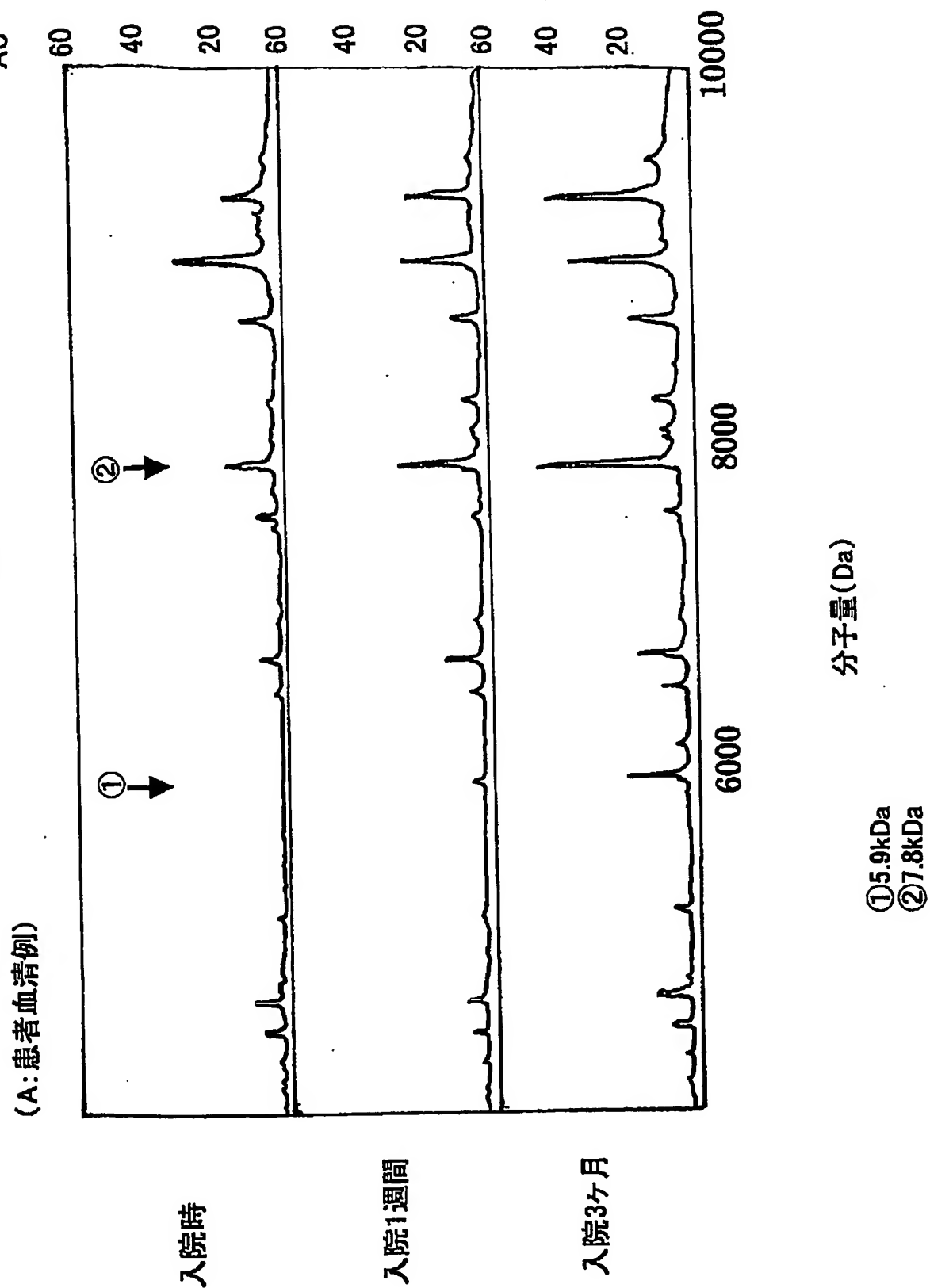


FIG.3

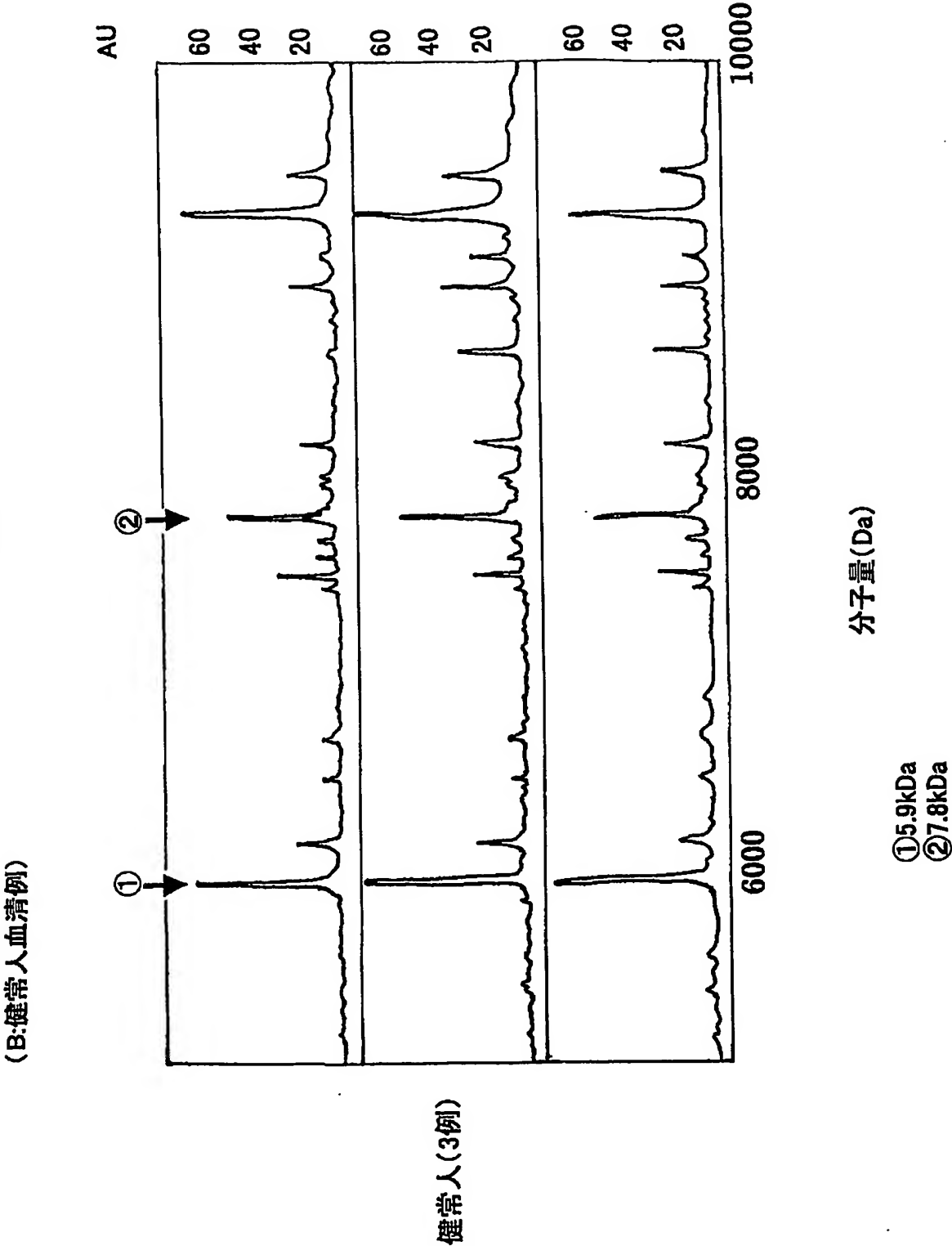
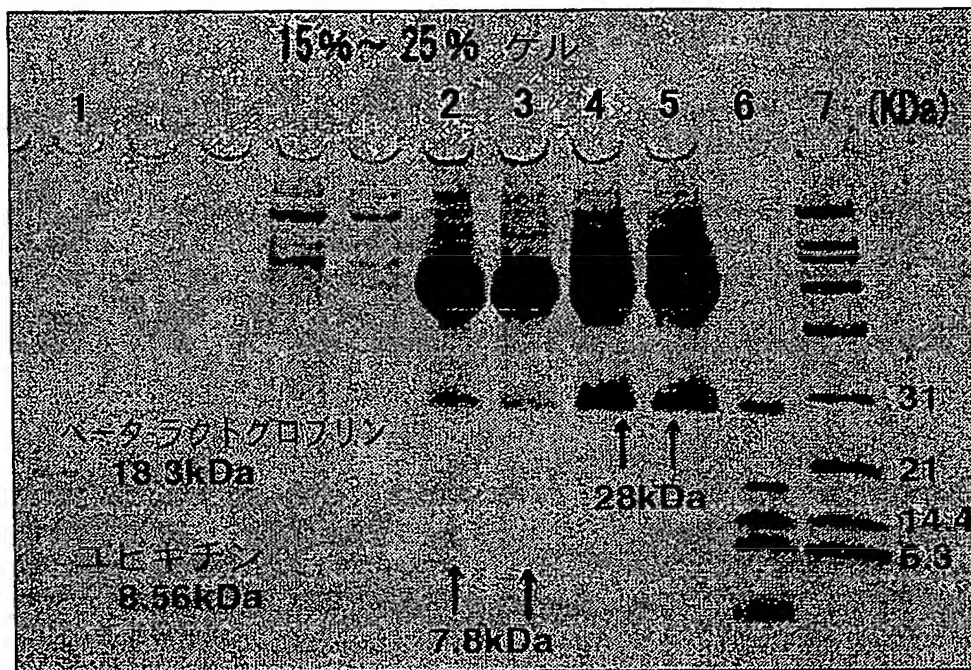




FIG.4



- 1 マーカー蛋白質
- 2 血清サンプル1
- 3 血清サンプル1
- 4 血清サンプル2
- 5 血清サンプル2
- 6 低分子マーカー
- 7 高分子マーカー

FIG.5

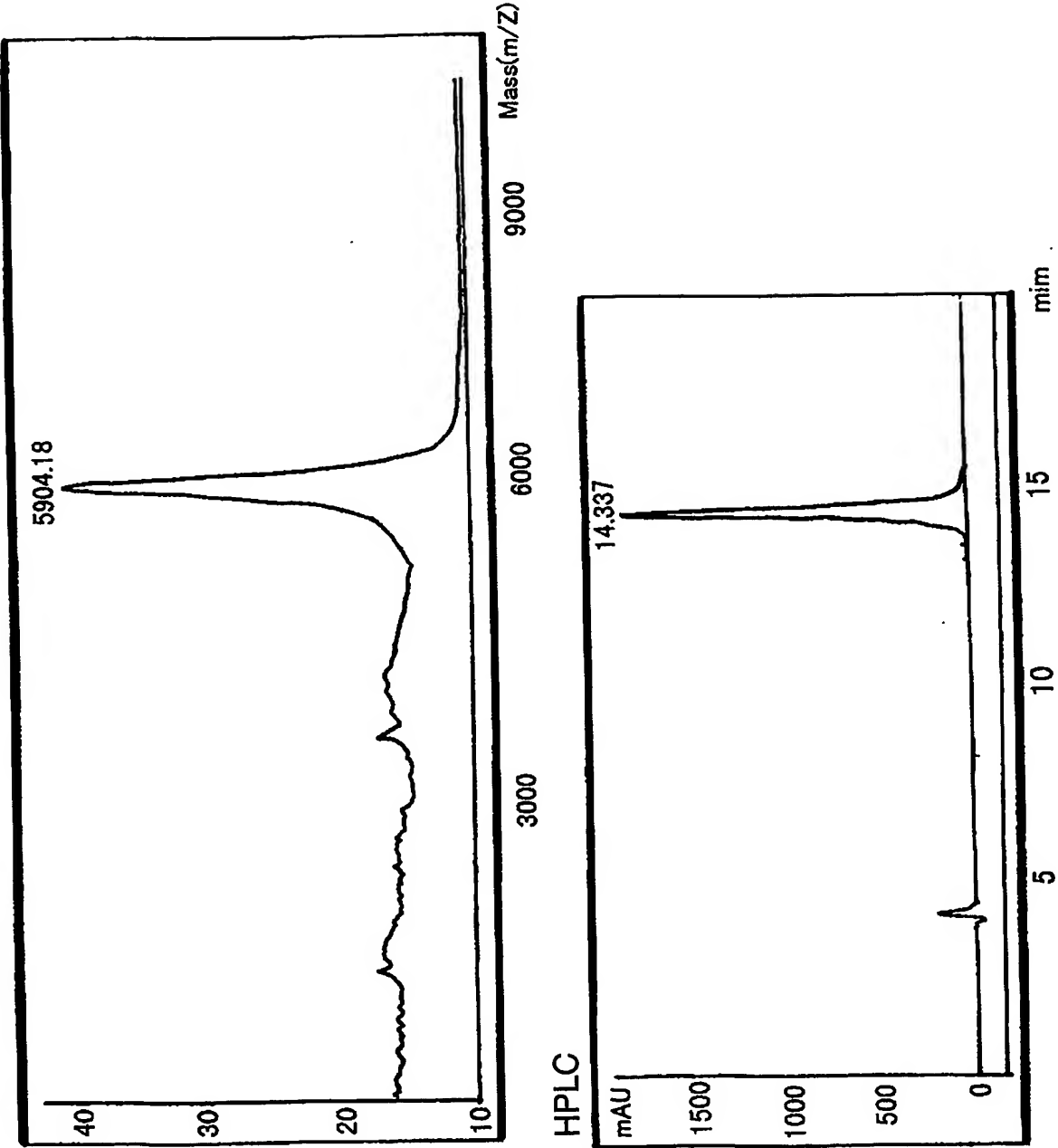
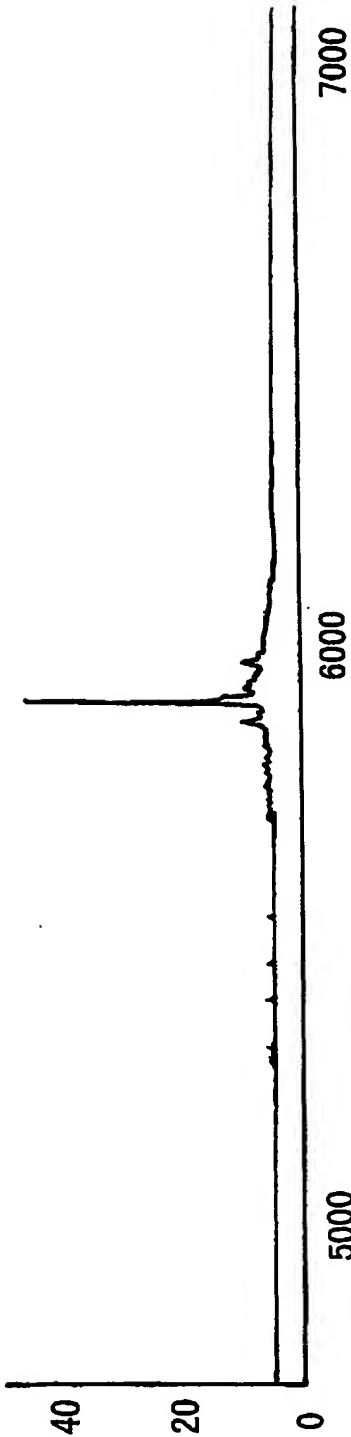
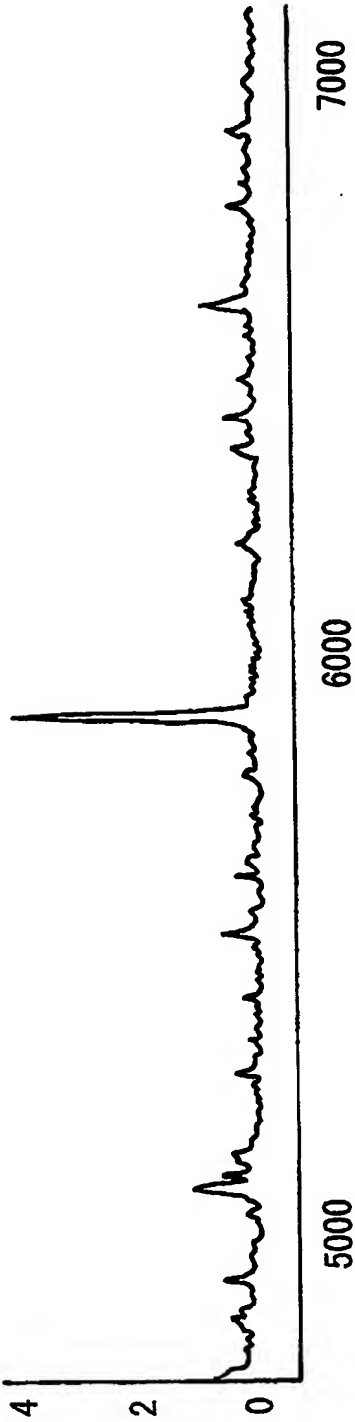


FIG.6

合成ペプチド



血清検体 飲酒0合



7/8

FIG.7

飲酒量による5.9kDaの蛋白質の変化

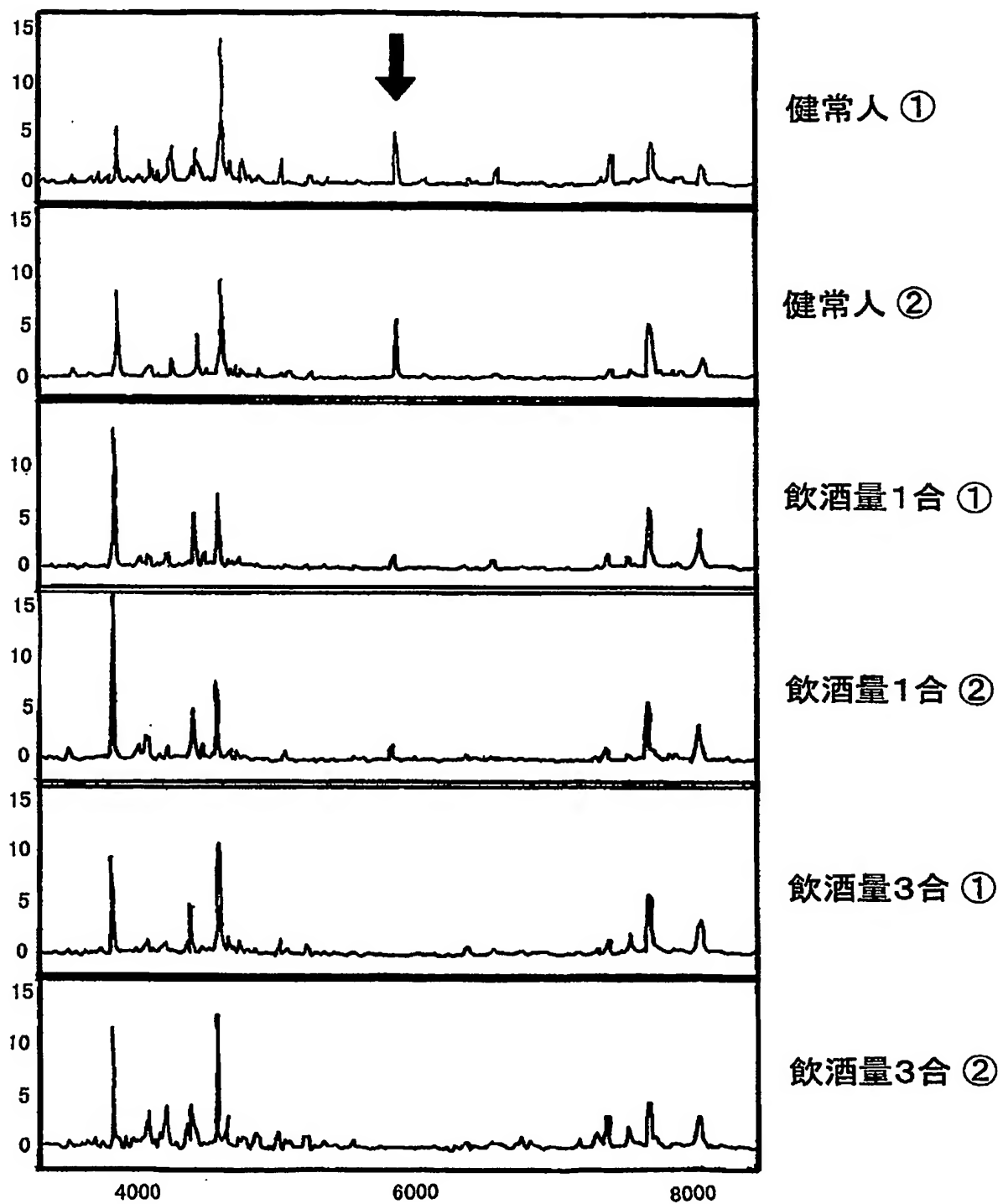
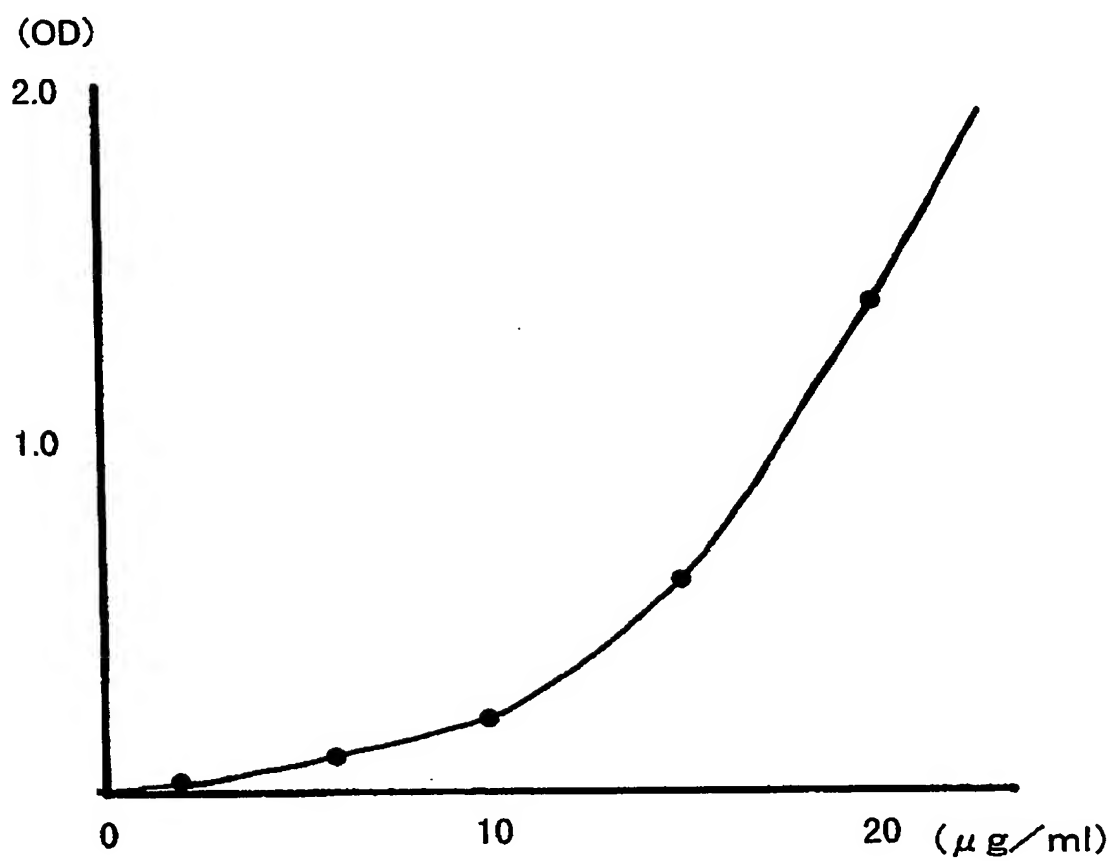


FIG.8

EIA法による5. 9kDa蛋白質測定用標準曲線



## SEQUENCE LISTING

<110> Maker Protein for Diagnosis of River Disease and Diagnosis Method  
of Liver Disease using the Protein

<120> Nitto Boseki Kabushiki Kaisya

<130> W1359-00

<150> JP 2002-371959

<151> 2002-12-24

<160> 3

<210> 1

<211> 54

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Ser Ser Tyr Ser Lys Gln Phe Thr Ser Ser Thr Ser Tyr Asn Arg

1

5

10

15

Gly Asp Ser Thr Phe Glu Ser Lys Ser Tyr Lys Met Ala Asp Glu Ala

20

25

30

Gly Ser Glu Ala Asp His Glu Gly Thr His Ser Thr Lys Arg Gly His

35

40

45

Ala Lys Ser Arg Pro Val

50

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 68

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Glu Pro Cys Val Glu Ser Leu Val Ser Gln Tyr Phe Gln Thr Val Thr  
1 5 10 15  
Asp Tyr Gly Lys Asp Leu Met Glu Lys Val Lys Ser Pro Glu Leu Gln  
20 25 30  
Ala Glu Ala Lys Ser Tyr Phe Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro  
35 40 45  
Leu Ile Lys Lys Ala Gly Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe  
50 55 60  
Val Glu Leu Gly  
65

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 243

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr  
1 5 10 15  
Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln  
20 25 30  
Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp

35	40	45
Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu		
50	55	60
Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu		
65	70	75
Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys		
85	90	95
Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met		
100	105	110
Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu		
115	120	125
Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu		
130	135	140
Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg		
145	150	155
Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala		
165	170	175
Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr		
180	185	190
His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys		
195	200	205
Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser		
210	215	220
Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu		
225	230	235
Asn Thr Gln		



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/16600

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K14/47, 14/75, 14/775, G01N27/62, 27/64,  
33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90, C07K14/00-14/825

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE (STN), JSTPlus (JOIS), PIR/SwissProt/GeneSeq, DDBJ/GenBank/  
EMBL/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Fumio NOMURA et al., "Protein Chip Technology ni yoru Aratana Inshu Marker no Tansaku", Alcohol to Igaku Seibutsugaku, 20 September, 2003 (20.09.03), Vol.23, pages 11 to 14	1-6, 17-21
X A	WO 01/86304 A2 (BAYER AG.), 15 November, 2001 (15.11.01), & EP 1150123 A1 & EP 1283989 A2	1-6, 19-21 17-18
X A	POYNARD T. et al., A Simple Biological Index for Detection of Alcoholic Liver Disease in Drinkers., Gastroenterology, 1991, Vol.100, No.5(Pt.1), pages 1397 to 1402	1-6, 19-21 17-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 10 March, 2004 (10.03.04)	Date of mailing of the international search report 23 March, 2004 (23.03.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/16600

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	JP 63-237795 A (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.), 04 October, 1988 (04.10.88), (Family: none)	<u>18</u> 1-6, 17, 19-21
A	WO 94/16085 A2 (ZYMOGENETICS, INC.), 21 July, 1994 (21.07.94), & US 5830700 A	1-6, 17-21

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/16600

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7-16

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

These claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions according to claims 1 to 21 involves 3 groups of inventions relating respectively to a marker protein of 5.9 kDa for diagnosing a liver disease, a marker protein of 7.8 kDa for diagnosing a liver disease and a marker protein for diagnosing a liver disease comprising apolipoprotein AI. Since there is no chemical structure common to the above 3 proteins, it is recognized that the technical feature common to them resides in being a marker for diagnosing a liver disease.

However, markers for diagnosing liver diseases had been widely known before the priority date of the present case, as reported in Gastroenterology 1991, Vol.100, No.5 (Pt.1) p.1397-1402. (Continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16600

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

Such being the case, it does not appear that there is a technical relationship among these 3 groups of inventions involving special technical features and these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/09, C07K 14/47, 14/75, 14/775, G01N 27/62, 27/64, 33/53

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/00-15/90, C07K 14/00-14/825

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), JSTPlus (JOIS), PIR/SwissProt/GeneSeq, DDBJ/GenBank/EMBL/GeneSeq  
BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	野村 文夫 他, プロテインチップテクノロジーによる新たな飲酒マーカの探索, アルコールと医学生物学, 2003. 09. 20, 第23巻, p. 11-14	1-6, 17-21
<u>X</u> A	WO 01/86304 A2 (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 2001. 11. 15 & EP 1150123 A1 & EP 1283989 A2	<u>1-6, 19-21</u> 17-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10. 03. 2004

国際調査報告の発送日

23. 3. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

三原 健治

4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	POYNARD T. et al. A Simple Biological Index for Detection of Alcoholic Liver Disease in Drinkers. Gastroenterology 1991, Vol. 100, No. 5 (Pt. 1) p. 1397-1402	<u>1-6, 19-21</u> 17-18
<u>X</u> A	JP 63-237795 A (株式会社 大塚製薬工場) 1988. 10. 04 (ファミリーなし)	<u>18</u> 1-6, 17, 19-21
A	WO 94/16085 A2 (ZYMOGENETICS, INC.) 1994. 07. 21 & US 5830700 A	1-6, 17-21

第1欄 請求の範囲の一部の調査ができないこと（第1欄の2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

請求の範囲 1-21 に記載された発明は、5.9 kDa 蛋白質でなる肝臓疾患診断用マーカータンパク質、7.8 kDa 蛋白質でなる肝臓疾患診断用マーカータンパク質、及びアポリポプロテイン AI でなる肝臓疾患診断用マーカータンパク質に係る 3 つの発明を包含しており、上述の 3 つのタンパク質には共通する化学構造が存在せず、3 者に共通する技術的特徴は肝臓疾患診断用マーカーである点にあると認められる。

しかしながら、肝臓疾患診断用マーカー自体はGastroenterology 1991, Vol. 100, No. 5 (Pt. 1) p. 1397-1402に記載されているように本願優先日前において広く知られていることから、3者は特別な技術的特徴を共有するものとは認められず、これらの発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

- 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。